

E3U



REC'D 30 JUN 2000	
WIPO	PCT

FR 00/1486 09/980484

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 05 JUIN 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **3 JUIN 1999**
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **9907011**
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75 INPI PARIS**
DATE DE DÉPÔT **03 JUIN 1999**

1 **NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE**

GROSSET-FOURNIER & DEMACHY
20, rue de Maubeuge
75009 PARIS

2 **DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle**

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen



demande initiale

☒ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent

références du correspondant

téléphone

IFB 99 AH CNR SOMA

01.42.81.09.81

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

PROCEDE DE MULTIPLICATION DE CELLULES SOUCHES.

3 **DEMANDEUR (S)** n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Forme juridique

C.N.R.S.

(Centre National de la Recherche Scientifique)

Nationalité (s) **FRANÇAISE**

Adresse (s) complète (s)

Pays

rue Michel-Ange
75794 PARIS CEDEX 16

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 **INVENTEUR (S)** Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 **RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES**

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 **DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE**

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 **DIVISIONS**

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 **SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE**

(nom et qualité du signataire)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

GROSSET-FOURNIER, Charles
422.5/PP112



BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99/07011

TITRE DE L'INVENTION :

PROCEDE DE MULTIPLICATION DE CELLULES SOUCHES

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

C.N.R.S.
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
3, rue Michel-Ange
75794 PARIS CEDEX 16
FRANCE

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

HATZFELD, Jacques Alexandre
44, rue Florian
92160 ANTONY, FRANCE

HATZFELD, Antoinette
44, rue Florian
92160 ANTONY, FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Paris, le 16 novembre 1999

Chantal GROSSET-FOURNIER
Mandataire
422.5/PP.112

PROCEDE DE MULTIPLICATION DE CELLULES SOUCHES

La présente invention a pour objet un procédé de multiplication de cellules souches. L'invention a notamment pour objet un procédé permettant à la fois de multiplier rapidement lesdites cellules souches et de les maintenir dans un état indifférencié.

Les cultures actuelles qui permettent le maintien des cellules souches dans un état indifférencié, et notamment des cellules souches hématopoïétiques, et/ou les multipliant, sont des cultures à long terme dans lesquelles les cellules se divisent très lentement. Plus particulièrement, les cultures permettant par exemple un autorenouvellement (une multiplication à l'identique) de cellules souches, notamment de cellules souches hématopoïétiques, sont uniquement des cultures sur stroma médullaire, ou des cultures à multiplication lente, en l'absence de stroma médullaire.

S'agissant plus particulièrement des cultures à long terme sur stroma médullaire, on peut citer les cultures de type Dexter, dans lesquelles les cellules souches, notamment les cellules souches hématopoïétiques, se développent sur un stroma médullaire, ce qui permet de n'utiliser que peu de cytokines mais entraîne une division lente des cellules (et donc une multiplication lente des cellules) en présence d'un mélange de progéniteurs avec des cellules matures hématopoïétiques et stromales.

De plus, contrairement à ce qui se passe chez la souris, il n'y a pas de maintien à long terme chez l'homme de cellules souches sur stroma.

S'agissant des cultures à long terme, en l'absence de stroma médullaire, on peut mentionner le système de culture de Piacibello. Dans ce système de culture (Piacibello et al. 1997 Blood), les cellules CD34⁺ contenant des cellules souches hématopoïétiques sontensemencées à 20000 cellules par ml, et chaque semaine la moitié de la culture est prélevée et remplacée par du milieu frais. Après deux semaines, le nombre de cellules double à un rythme de une fois par semaine, sur plusieurs mois. Pendant les deux premières semaines de la culture de Piacibello, il y a une forte perte des cellules CD34⁺ qui se stabilisent à moins de 2%.

Ainsi, les cultures actuelles sont peu compatibles avec une production à des fins cliniques ou biotechnologiques de cellules souches maintenant leur caractère indifférencié et multipotent.

Par ailleurs, à ce jour on ne connaît pas d'inhibiteur de la différenciation de cellules souches permettant un autorenouvellement continu satisfaisant.

L'un des principaux buts de l'invention est de proposer un procédé de culture de cellules souches permettant d'obtenir, rapidement et en quantité importante, des cellules souches humaines dans un état indifférencié.

5 L'un des buts de l'invention est de proposer un procédé rapide de culture de cellules souches, sans stroma médullaire, et permettant de réduire les volumes de culture.

L'un des autres buts de l'invention est d'utiliser les cellules souches ainsi obtenues pour reconstituer des tissus et des organes à transplanter.

10 L'invention a pour objet l'utilisation d'un inhibiteur du développement cellulaire de façon contrôlée pour maintenir l'état indifférencié de cellules souches, notamment de cellules souches humaines, tout en permettant leur division cellulaire.

15 La présente invention découle de la découverte faite par les Inventeurs que, dans certaines conditions, un inhibiteur du développement cellulaire peut être également un inhibiteur de la différenciation cellulaire de cellules souches. A ce titre, le TGF- β (« transforming growth factor » (facteur de croissance transformant)), préalablement connu comme un inhibiteur du développement cellulaire de cellules souches, et notamment de cellules souches hématopoiétiques ou progéniteurs primitifs hématopoiétiques se révèle être, selon l'invention, un inhibiteur de la différenciation cellulaire.

20 L'expression « inhibiteur du développement cellulaire » englobe à la fois toute substance inhibant la prolifération cellulaire et/ou la croissance cellulaire, et/ou la différenciation cellulaire.

L'expression « inhibiteur de la prolifération cellulaire » signifie également inhibiteur de la division cellulaire, ou inhibiteur du cycle cellulaire.

25 L'expression « utilisation d'un inhibiteur du développement cellulaire de façon contrôlée » signifie que l'inhibiteur du développement cellulaire est utilisé de façon modulable afin de permettre :

30 (a) la division cellulaire des cellules souches lorsque celle-ci est souhaitée, tout en maintenant l'état indifférencié desdites cellules souches au cours ou à la fin de la division cellulaire, ou,

(b) l'inhibition du développement cellulaire des cellules souches lorsque celui-ci est nécessaire pour inhiber la différenciation cellulaire desdites cellules souches.

L'expression « utilisation d'un inhibiteur du développement cellulaire de façon contrôlée » signifie, en d'autres termes, que l'inhibiteur du développement cellulaire

peut être utilisé dans des conditions telles que les cellules souches sont sorties de leur état de repos afin de se diviser, dans des conditions contrôlées empêchant la différenciation.

L'expression « cellules souches » signifie cellules immatures, ou bien cellules non différenciées (ou indifférenciées), ou bien cellules primitives, ou bien cellules pluripotentes ou cellules multipotentes.

Les cellules souches avantageusement utilisées selon l'invention sont des cellules souches humaines choisies dans le groupe constitué par les cellules souches embryonnaires à l'origine des cellules souches somatiques, et/ou les cellules souches/progéniteurs somatiques elles/eux mêmes à l'origine du sang et/ou de différents tissus solides tels que la peau, le foie, le pancréas, le cœur, le rein, l'os, ou du tissu nerveux.

L'expression « cellules souches embryonnaires à l'origine des cellules souches somatiques » est définie par exemple comme une cellule pouvant donner naissance à l'une quelconque des cellules souches somatiques.

L'expression « cellules souches somatiques » est définie par exemple comme une cellule pouvant donner naissance à un tissu spécifique.

Les cellules souches selon l'invention sont notamment les cellules souches somatiques humaines hématopoïétiques, encore appelées progéniteurs primitifs hématopoïétiques.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'inhibiteur du développement cellulaire utilisé avantageusement selon l'invention est choisi dans le groupe constitué par les produits de gènes contrôlant le développement cellulaire vis-à-vis de la différenciation cellulaire et/ou de la division cellulaire, les inhibiteurs des kinases cyclines dépendantes, les facteurs contrôlant l'apoptose ou le vieillissement, et les cytokines (tels que les interférons, le TGF- β). Par le terme "cytokines", on désigne tous les facteurs de croissance, même si ces facteurs peuvent agir également comme des inhibiteurs de la croissance dans certaines conditions.

Comme produits de gènes contrôlant le développement cellulaire vis-à-vis de la différenciation cellulaire et/ou de la division cellulaire, on peut notamment citer les facteurs de croissance, les cytokines, le produit de gènes contrôlant la différenciation, le vieillissement ou l'apoptose.

Comme inhibiteurs des kinases cyclines dépendantes on peut notamment citer le gène du rétinoblastome, les gènes P15, P16, P21, P27.

Le gène du rétinoblastome est un gène suppresseur de tumeur (anti-oncogène).

Les gènes P15, P16, P21, P27 inhibent le cycle cellulaire.

Comme facteur contrôlant l'apoptose, on peut notamment citer les gènes bcl-2, bax, fas.

5 Comme facteur contrôlant le vieillissement, on peut notamment citer la télomerase.

Comme cytokines pouvant être des inhibiteurs du développement cellulaire, on peut notamment citer les interférons et en particulier le TGF- β .

10 Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention a pour objet l'utilisation d'un inhibiteur du développement cellulaire tel que défini ci-dessus, en association séquentielle avec un anti-inhibiteur de la prolifération cellulaire, pour déclencher un nombre de divisions cellulaires allant de 1 à environ 100, notamment de 1 à environ 10, et notamment pour déclencher une seule division cellulaire, tout en maintenant l'état indifférencié des cellules souches, notamment des cellules souches humaines.

15 L'expression « association séquentielle » signifie que l'anti-inhibiteur de la prolifération cellulaire n'est pas utilisé de façon simultanée avec l'inhibiteur du développement cellulaire.

20 Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention a pour objet un procédé de multiplication de cellules souches dans un milieu de culture, notamment de cellules souches humaines, caractérisé en ce qu'il comprend :

25 - une étape dans laquelle les cellules souches, notamment les cellules souches humaines, à l'état de repos sont sorties de leur état de repos par la neutralisation de l'effet d'un inhibiteur du développement cellulaire, et notamment d'un inhibiteur de la prolifération cellulaire, produit par les cellules et/ou présent dans le milieu de culture, de telle sorte qu'il y ait déclenchement d'un nombre de divisions cellulaires allant de 1 à environ 100, notamment de 1 à environ 10, et notamment d'une seule division cellulaire,

30 - et, une étape dans laquelle les cellules souches, notamment les cellules souches humaines, obtenues à l'étape précédente sont inhibées dans leur différenciation, à l'aide d'un inhibiteur du développement cellulaire.

L'invention a également pour objet un procédé de multiplication de cellules souches dans un milieu de culture, notamment de cellules souches humaines, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape selon laquelle les cellules souches, notamment les cellules souches humaines, à l'état de division sont empêchées d'entrer dans un état de différenciation, à l'aide d'un inhibiteur du développement cellulaire,

- et, une étape selon laquelle les cellules souches, notamment les cellules souches humaines, obtenues à l'étape précédente sont remises dans leur état de division, par la neutralisation de l'effet d'un inhibiteur du développement cellulaire, et notamment d'un inhibiteur de la prolifération cellulaire, de telle sorte qu'il y ait déclenchement d'un nombre de divisions cellulaires allant de 1 à environ 100, notamment de 1 à environ 10, et notamment d'une seule division cellulaire.

Le procédé de multiplication selon l'invention est caractérisé en ce que, au cours et à l'issue dudit procédé, les cellules souches ainsi multipliées sont maintenues dans un état indifférencié.

Selon l'invention, l'expression « cellules souches multipliées » a la même signification que l'expression « cellules souches amplifiées ». De même l'expression « procédé de multiplication » a la même signification que l'expression « procédé d'amplification ».

L'état de repos des cellules signifie que les cellules ne se différencient pas et ne se divisent pas.

Selon un mode de réalisation avantageux, les cellules souches multipliées selon le procédé de multiplication de l'invention, sont des cellules souches humaines choisies dans le groupe constitué par les cellules souches embryonnaires à l'origine des cellules souches somatiques, et les cellules somatiques elles-mêmes à l'origine du sang et/ou des différents tissus solides tels que la peau, le foie, le pancréas, le cœur, le rein, l'os, ou du tissu nerveux.

Le procédé de multiplication selon l'invention est caractérisé en ce que les cellules souches, notamment les cellules humaines, sont présentes à une concentration cellulaire d'environ 1 à environ 10^{10} cellules par ml, et notamment à une concentration allant d'environ 10^3 à environ 10^{10} cellules par ml, et plus particulièrement d'environ 10^4 à environ 10^9 cellules par ml.

Il faut noter que la présente invention s'applique aussi bien aux cellules humaines qu'aux cellules animales.

Dans le procédé de multiplication de l'invention, l'inhibiteur du développement cellulaire est synthétisé par les cellules souches, notamment les cellules souches

humaines, et/ou est ajouté dans le milieu de culture contenant les cellules souches, notamment les cellules souches humaines.

Ledit inhibiteur du développement cellulaire est synthétisé par les cellules souches et/ou est ajouté dans le milieu de culture :

- 5 (a) avant la première division cellulaire, et
- (b) au cours ou à la fin d'un cycle de division (lorsque lesdites cellules se trouvent préalablement en état de division).

Lorsque l'inhibiteur du développement cellulaire est synthétisé par les cellules souches, il peut être sécrété ou non.

10 La quantité d'inhibiteur du développement cellulaire synthétisée par les cellules souches, ou ajoutée dans le milieu de culture, doit être suffisante de façon à ce que lesdites cellules (a) soient maintenues dans leur état de repos avant la première division cellulaire, et (b) soient placées à l'état de repos lorsqu'elles se trouvaient préalablement en état de division.

15 La quantité d'inhibiteur du développement cellulaire synthétisée par les cellules souches peut varier de 0,01 pg à 1 mg/ml dans le milieu de culture, et notamment de 0,1 pg à 10 ng/ml.

La quantité d'inhibiteur du développement cellulaire ajoutée dans le milieu de culture peut varier de 0,1 pg à 1 mg/ml dans le milieu de culture, et notamment de 1 pg à 10 ng/ml.

20 Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé de multiplication selon l'invention est caractérisé en ce que l'inhibiteur du développement cellulaire est choisi dans le groupe constitué par les produits de gènes contrôlant le développement cellulaire vis-à-vis de la différenciation cellulaire et/ou de la division cellulaire, les inhibiteurs des kinases cyclines dépendantes, les facteurs contrôlant l'apoptose ou le

25 vieillissement, et les cytokines (tels que les interférons, le TGF β).

Les produits de gènes contrôlant le développement cellulaire vis-à-vis de la différenciation cellulaire et/ou de la division cellulaire, les inhibiteurs des kinases cyclines dépendantes, les facteurs contrôlant l'apoptose ou le vieillissement, ainsi que

30 les cytokines sont notamment ceux décrits ci-dessus.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'inhibiteur du développement cellulaire est présent à une faible concentration dans le milieu de culture contenant les cellules souches, et notamment à une concentration allant d'environ 10^{-10} mg/ml à 1 mg/ml.

Le procédé de multiplication selon l'invention est caractérisé en ce que la neutralisation de l'effet de l'inhibiteur du développement cellulaire, et notamment de l'inhibiteur de la prolifération cellulaire, présent dans le milieu de culture, est effectuée par :

- 5 - l'addition dans le milieu de culture d'un anti-inhibiteur de la prolifération cellulaire, et/ou
- le retrait du milieu de culture de l'inhibiteur du développement cellulaire, et notamment de l'inhibiteur de la prolifération cellulaire.

La neutralisation de l'effet de l'inhibiteur du développement cellulaire permet aux
10 cellules souches de sortir de leur état de repos et de déclencher au moins une division.

De préférence, lorsque l'inhibiteur du développement cellulaire est synthétisé sans être secrété par les cellules souches, l'effet dudit inhibiteur est neutralisé par addition dans le milieu de culture d'un anti-inhibiteur de la prolifération cellulaire, qui peut pénétrer dans la cellule, tel qu'un oligonucléotide antisens.

15 Cependant, lorsque l'inhibiteur du développement cellulaire est secrété par les cellules souches, ou lorsque ledit inhibiteur est ajouté dans le milieu de culture, l'effet dudit inhibiteur est neutralisé soit par addition dans le milieu de culture d'un anti-inhibiteur de la prolifération cellulaire, soit par retrait du milieu de culture de l'inhibiteur du développement cellulaire.

20 Le retrait de l'inhibiteur du développement cellulaire du milieu de culture peut notamment être effectué à l'aide d'anticorps bloquants ou par lavage afin de neutraliser ledit inhibiteur.

La quantité d'inhibiteur du développement cellulaire retirée du milieu de culture contenant les cellules souches doit être suffisante de telle sorte qu'il y ait déclenchement
25 d'un nombre de divisions cellulaires allant de 1 à environ 100, notamment de 1 à environ 10, et notamment d'une seule division cellulaire.

La quantité d'inhibiteur du développement cellulaire retirée du milieu de culture varie de 0,01 pg à 1 ng/ml, et notamment de 0,1 pg à 10 ng/ml.

30 L'inhibiteur du développement cellulaire retiré du milieu de culture appartient notamment au groupe des cytokines, des oligonucléotides antisens bloquant l'expression de gènes du développement.

La quantité d'anti-inhibiteur de la prolifération cellulaire ajoutée dans le milieu de culture contenant les cellules souches doit être suffisante de telle sorte qu'il y ait

déclenchement d'un nombre de divisions cellulaires allant de 1 à environ 100, notamment de 1 à environ 10, et notamment d'une seule division cellulaire.

La quantité d'anti-inhibiteur de la prolifération cellulaire ajoutée dans le milieu de culture varie de 0,1 μg à 10 mg/ml pour les anticorps bloquants ou de 0,01 μM à 1 mM d'oligonucléotide antisens dans le milieu de culture, et notamment de 1 μg à 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pour les anticorps bloquants ou de 0,1 μM à 100 μM d'oligonucléotides antisens.

L'anti-inhibiteur de la prolifération cellulaire est choisi dans le groupe constitué par des oligonucléotides antisens ou des anticorps bloquants et notamment par l'anti-TGF- β .

Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé de multiplication selon l'invention est caractérisé en ce que l'anti-inhibiteur de la prolifération cellulaire est présent en une concentration allant d'environ 10^{-18} à environ 10^{-3} g/ml, notamment 0,1 à 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, et notamment $4 \cdot 10^{-6}$ g/ml (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Le procédé de multiplication selon l'invention des cellules souches, notamment des cellules souches humaines, est caractérisé en ce qu'il comporte, afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules souches maintenues à l'état indifférencié, un nombre total de cycles de divisions (ou d'états de division) compris entre 1 à 100 cycles, notamment entre 5 à 20 cycles, et notamment 10 cycles.

Selon un mode de réalisation avantageux, la durée totale de l'ensemble des états de repos du procédé de multiplication selon l'invention varie de 1 heure à 3 ans, notamment de 20 heures à 200 heures, et la durée totale de l'ensemble des cycles de division du procédé de multiplication selon l'invention varie de 10 heures à 3 ans et notamment de 20 heures à 200 heures.

Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé de multiplication selon l'invention est caractérisé en ce que la durée d'un seul état de repos s'échelonne d'environ 1 heure à 3 ans, et est notamment d'environ 6 heures à 72 heures, et en ce que la durée d'un seul cycle de division s'échelonne d'environ 6 heures à 3 ans, et est notamment d'environ 6 heures à 24 heures.

La durée totale du procédé de multiplication selon l'invention comprenant l'ensemble des états de repos et de division s'échelonne de 1 jour à 3 ans, et est notamment de 1 jour à 15 jours.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'ensemble des cycles de repos et de division d'un procédé de multiplication dure de 1 à 15 jours, et les applications envisagées sont la thérapie cellulaire.

Selon un autre mode de réalisation, l'ensemble des cycles de repos et de division d'un procédé de multiplication dure de 1 jour à 3 ans, et les applications envisagées sont d'ordre expérimental.

Un procédé qui dure 3 ans permet par exemple des expériences de longue durée pour étudier la sénescence.

Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé de multiplication des cellules souches selon l'invention, et notamment des cellules souches somatiques humaines, permet d'obtenir une amplification des cellules souches d'un facteur compris d'environ 2 à environ 10^{12} , et notamment d'environ 2 à environ 10^4 .

Ainsi, le procédé de multiplication selon l'invention permet d'obtenir un nombre de cellules souches amplifiées et maintenues à l'état indifférencié, de 2 à 10^{12} fois plus important que le nombre initial de cellules souches non différenciées.

Selon un mode de réalisation avantageux, le milieu de culture du procédé de multiplication selon l'invention, contient des cellules souches hématopoiétiques et comprend une ou plusieurs cytokines (ajoutées dans le milieu de culture) choisies dans le groupe constitué par les interleukines et les CSF, lesdites cytokines étant présentes à une concentration allant d'environ 10^{-8} µg/ml à environ 1 mg/ml, et notamment d'environ 10^{-5} µg/ml à 0,1 µg/ml, et éventuellement d'autres facteurs de croissance.

Comme cytokines pouvant être ajoutées dans le milieu de culture, on citera notamment les interleukines telles que l'IL 1 à l'IL 16, les CSF (« colony-stimulating factor » (facteurs stimulant les colonies)) tels que le GM-CSF (facteur stimulant les colonies granulocytaires et monocytaires), GCSF (facteur stimulant les colonies granulocytaires), MCSF (facteur stimulant les colonies monocytaires), SF (Steel factor), la TPO (thrombopoïétine) ou le FL (Flt-3 ligand).

Des facteurs de croissance autres que les interleukines et les CSF peuvent être utilisés.

Le procédé de multiplication selon l'invention des cellules souches, et notamment des cellules souches somatiques humaines, est plus particulièrement caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) l'initiation d'un premier cycle de division de cellules souches embryonnaires ou somatiques non différenciées dans un milieu de culture, et notamment de cellules

souches somatiques hématopoïétiques, par ensemencement desdites cellules souches non différenciées à l'état de repos, à une forte concentration cellulaire initiale, notamment à une concentration allant de 10^3 à 10^{10} cellules par ml, en présence d'une ou de plusieurs cytokines, et par la neutralisation de l'effet de l'inhibiteur du développement cellulaire, et notamment de l'inhibiteur de la prolifération cellulaire, présent dans le milieu de culture, de telle sorte que les susdites cellules sortent de leur état de repos par le déclenchement d'une première division cellulaire,

b) le retour au repos des cellules souches embryonnaires ou somatiques non différenciées obtenues à l'étape précédente, à l'aide d'un inhibiteur du développement cellulaire, ledit inhibiteur étant synthétisé par lesdites cellules souches, ou étant ajouté dans le milieu de culture,

c) le lavage éventuel des cellules souches embryonnaires ou somatiques non différenciées obtenues à l'étape précédente, afin d'éliminer les catabolites et l'inhibiteur du développement cellulaire, et notamment l'inhibiteur de la prolifération cellulaire éventuellement présents dans le milieu de culture,

d) la dilution éventuelle des cellules souches embryonnaires ou somatiques non différenciées obtenues à l'étape précédente afin de maintenir une concentration cellulaire optimale allant d'environ 100 à 10^{10} cellules par ml,

e) la répétition successive des cycles de division et de repos décrits ci-dessus jusqu'à ce que le facteur d'amplification des cellules soit suffisant pour obtenir le nombre de cellules souches souhaitées, et notamment soit de 2 fois à environ 10^{12} fois le nombre de cellules souches embryonnaires ou somatiques non différenciées initiales, ce qui correspond à une durée totale du procédé de multiplication d'environ 1 jour à 3 ans, et notamment de 1 jour à 15 jours,

f) l'arrêt de la multiplication des cellules souches embryonnaires ou somatiques non différenciées pour les stocker, les utiliser ou les faire se différencier *in vitro*.

Les modalités des différentes étapes du procédé de multiplication des cellules souches selon l'invention sont celles déjà décrites ci-dessus.

Ainsi, la quantité d'anti-inhibiteur de la prolifération cellulaire ajoutée dans le milieu de culture, ou la quantité d'inhibiteur du développement cellulaire retirée du milieu de culture contenant les cellules souches, doit être suffisante afin qu'il y ait déclenchement d'une première division cellulaire.

Selon un mode de réalisation préféré, l'inhibiteur du développement cellulaire est le TGF- β ; le TGF- β est synthétisé par les cellules souches somatiques hématopoïétiques elles-mêmes en une quantité allant de 0,01 pg à 1 ng/ml.

Le TGF- β est ensuite neutralisé par l'ajout dans le milieu de culture d'un anti-inhibiteur de la prolifération cellulaire : l'anti-TGF- β . L'anti-TGF- β est ajouté en une quantité allant de 0,1 μ g à 100 μ g/ml d'anticorps ou 0,1 μ M à 10 μ M d'oligonucléotides.

Le retour au repos des cellules souches somatiques hématopoïétiques, notamment décrit dans l'étape b) ci-dessus, est obtenu par le TGF- β synthétisé par lesdites cellules souches elles-mêmes (ou d'autres inhibiteurs ajoutés).

L'étape de lavage © décrite ci-dessus permet notamment de neutraliser l'inhibiteur TGF- β formé au cours ou à la fin d'un cycle de division précédent afin de permettre la division suivante.

L'étape de dilution (d) décrite ci-dessus, maintenant une concentration cellulaire optimale permet à la fois :

- le retour rapide à l'état de repos des cellules souches, dû à une synthèse rapide desdites cellules de l'inhibiteur du développement cellulaire, notamment du TGF- β ,
- une division non moins rapide des cellules souches après chaque état de repos, en présence d'anti-inhibiteur de la prolifération cellulaire, notamment d'anti-TGF- β .

Le TGF- β ralentit le processus de différenciation des cellules souches tout au long du procédé de multiplication, à savoir au cours et à la fin des différents cycles de repos et de division.

L'étape d'arrêt f) décrite ci-dessus peut être effectuée en lavant lesdites cellules souches ainsi multipliées, en les congelant, ou en les mettant dans un milieu de différenciation.

Le milieu de différenciation dans lequel sont mises les cellules souches ainsi multipliées et maintenues dans un état indifférencié selon le procédé de la présente invention, est choisi en fonction du tissu ou de l'organe que l'on cherche à reconstituer.

Par exemple, si l'on veut obtenir des cellules érythroïdes, on utilisera un milieu de culture contenant de l'érythropoïétine (EPO).

Le procédé de multiplication selon l'invention permet d'obtenir des productions importantes de cellules souches, lesdites cellules souches étant maintenues dans un état indifférencié au cours des différents cycles de repos et de division dudit procédé. On obtient ainsi des productions importantes de cellules immatures sous un volume réduit.

La présente invention a pour objet l'utilisation des cellules souches humaines non différenciées et amplifiées telles qu'obtenues selon le procédé de l'invention décrit ci-dessus, pour reconstituer du sang humain et/ou des tissus solides ou organes humains.

Ainsi, les cellules souches humaines non différenciées et amplifiées telles qu'obtenues selon le procédé de l'invention, peuvent notamment être utilisées pour amplifier des prélèvements insuffisants de sang de cordon ombilical, de moëlle osseuse ou de sang périphérique, ou pour la transplantation de cellules souches hématopoïétiques.

Les cellules souches humaines non différenciées et amplifiées telles qu'obtenues selon le procédé de l'invention, peuvent également servir pour des études sur le génome humain (expression et fonction des gènes du développement humain).

Légende des figures

Les figures 1A et 1B représentent l'effet du TGF- β sur le maintien de l'état indifférencié des cellules CD34⁺.

Le colorant PKH26 qui se fixe à la membrane des cellules permet de déterminer le nombre de divisions que la cellule a effectué : après un doublement de la cellule, l'intensité du colorant est divisée par 2, après 2 doublements par 4 etc... On obtient ainsi différentes populations se déplaçant vers la droite.

En conditions de culture sans TGF- β (20 000 cellules par ml) (Fig. 1A), les cellules se divisent et après 3 jours, les cellules qui se sont divisées plus d'une fois ne contiennent que 1.1% de cellules CD34^{+fort}.

En conditions de culture selon l'invention, la concentration de TGF- β étant plus élevée (30 pg/ml de TGF- β) (Fig. 1B), on observe un pourcentage plus élevé de cellules CD34^{+fort}.

EXEMPLE : PROCEDE DE MULTIPLICATION DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏETIQUES

Matériels et méthodes

Les cellules souches utilisées dans l'exemple ci-dessous sont plus particulièrement des cellules souches somatiques humaines hématopoïétiques provenant de sang de cordon ombilical et caractérisées par le marqueur de membrane CD34+. Dans ce qui suit, lesdites cellules seront dénommées « cellules CD34+ ».

1) Marquage des cellules CD34+

Les cellules CD34+ sont diluées dans PBS (phosphate buffer saline) / BSA (bovine serum albumine) (0,2%) et incubées avec des anticorps anti-CD34+ conjugués à du FITC (fluoroisothiocyanate)(clone 8G12; Becton Dickinson, San José, CA) pendant 30 minutes à 4°C puis lavées 2 fois en PBS/BSA. Le contrôle est constitué par des cellules incubées avec des IgG1 non spécifiques conjuguées au FITC.

Pour détecter le colorant permettant de suivre la prolifération des cellules, les CD34+ sont marquées avec le colorant PKH26 (Sigma, France) selon les instructions du fabricant.

Les cellules avec une intensité moyenne de PKH26 sont triées dans une fenêtre représentant environ 10% de la largeur complète. Ceci correspond environ à 20% des cellules CD34+. Quatre aliquots de 400 cellules sont utilisées en test HPP-Q. Le reste des cellules au repos et des cellules qui prolifèrent sont triées et cultivées en milieu semi-solide. Des billes calibrées (Coulter-Beckman) sont utilisées pour standardiser les analyses entre le jour 0 et le jour 3.

Description du test HPP-Q (High Proliferative Potential-Quiescent Cell)

Le test HPP-Q permet de vérifier que l'inhibiteur du développement cellulaire, notamment le TGF- β , maintient les cellules souches, notamment hématopoïétiques, au repos.

Plus particulièrement, le test HPP-Q consiste à déterminer le degré de maturité de cellules souches, notamment hématopoïétiques, et est caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- on effectue la culture d'un premier ensemble de cellules souches, notamment hématopoïétiques, dans un milieu approprié à leur culture, ledit milieu ne contenant pas de moyens de blocage d'au moins un inhibiteur du développement cellulaire tel le TGF- β , pendant environ 14 à environ 28 jours, de préférence 18 jours,

- on effectue la culture d'un deuxième ensemble de cellules souches, notamment hématopoïétiques, de même nature et de même degré de maturité que celles mentionnées ci-dessus, dans un milieu approprié contenant des moyens de blocage d'au moins un inhibiteur du développement cellulaire, ces moyens de blocage étant présents, dans le milieu de culture à une concentration efficace,

- on compare, 18 jours après la mise en culture de chacun des deux ensembles de cellules souches, le nombre et la nature des colonies, la différence des sommes des colonies à haut potentiel prolifératif (HPP-CFC = progéniteur formant une colonie à haut potentiel prolifératif, HPP-MEG = progéniteur mégacaryocytaire à haut potentiel prolifératif, HPP-GEMM = progéniteur granulocytaire érythrocytaire monocytaire mégacaryocytaire à haut potentiel prolifératif) respectivement dans celle du deuxième ensemble et celle du premier ensemble.

L'évaluation de la maturité ou de l'immaturité de cellules souches correspond à l'observation suivante.

Après 18 jours, on observe au microscope le nombre et la nature des colonies : on compte le nombre de colonies mixtes constituées de cellules de la lignée rouge et d'un ou de plusieurs types de la lignée blanche. Le nombre de colonies mixtes est plus élevé lorsque la population cellulaire mise en culture est immature, c'est-à-dire constituée de cellules plus jeunes dont certaines sont au repos. D'autre part, plus la cellule qui a donné naissance à la colonie est immature, voire au repos, plus son potentiel de prolifération est grand, donc la colonie provenant de cette cellule une fois activée sera plus importante en taille.

2) Culture des cellules CD34+

Les cellules CD34+ ont étéensemencées à une concentration cellulaire de 10^6 cellules par ml dans des plaques de culture de 24 puits à raison de 1 ml par puits au jour J0. Lesdites cellules ont étéensemencées dans un milieu sans sérum, contenant des cytokines et un inhibiteur du TGF- β (anti TGF- β).

« Milieu » :

SBA (milieu sans sérum avec albumine) +	
SF(« Steel Factor »)	10 ng/ml
TPO (Thrombopoïétine)	10 ng/ml
FL (Ligand FLt3)	50 ng/ml
IL6 (Interleukine 6)	10 ng/ml
Anti-TGFβ	4 µg/ml

Les cellules CD34⁺ sont incubées à 37°C dans une atmosphère avec 5% de CO₂ et une saturation d'humidité à 97%.

Tous les 2 jours, le volume de la culture est mesuré, le nombre de cellules CD34⁺ est compté, et la viabilité desdites cellules est déterminée.

Après avoir compté le nombre de cellules CD34⁺ contenues dans la culture, on enlève le volume nécessaire pour ne laisser que 10⁶ cellules par puits.

On réajuste le milieu en volume, en cytokines ou facteurs de croissance et en inhibiteur du TGF-β.

Tous les 8 jours, un tri est effectué pour évaluer les cellules CD34⁺ et CD38⁻ et la capacité proliférative des cellules CD34⁺ est évaluée en test HPP-Q.

Régulièrement, les résultats du test HPP-Q sont confirmés par un test en souris immunodéficientes (SCID-NOD).

Le protocole du procédé selon l'invention permet de cultiver les cellules dans un microbioréacteur qui maintient les conditions de milieux constantes pour ce qui est des catabolites et anabolites (cytokines et inhibiteurs exclus).

L'ensemencement des cellules CD34⁺ à une forte concentration cellulaire permet de créer un bioréacteur à forte concentration cellulaire, et ainsi de réduire les volumes de culture.

Principe du bioréacteur ou microbioréacteur

Le microbioréacteur est constitué d'une chambre de culture, de taille adaptée au nombre de cellules et à leur densité cellulaire (1 à 100 ml), séparée d'une chambre de dialyse par une membrane, et éventuellement d'une chambre gazeuse par une autre membrane, pour maintenir constants les constituants du milieu.

Des micro détecteurs permettent de contrôler différents paramètres dans la chambre de culture : pH, CO₂, O₂, glucose, lactate, etc.

Des entrées et des sorties permettent de renouveler ou de modifier les milieux de cultures, ou d'ajouter ou de retirer des cellules.

L'ensemble du microbioréacteur peut être automatisé par des pompes et des programmeurs informatisés.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un inhibiteur du développement cellulaire de façon contrôlée pour maintenir l'état indifférencié de cellules souches, notamment de cellules souches humaines, tout en permettant leur division cellulaire.

5 2. Utilisation d'un inhibiteur selon la revendication 1, dans laquelle les cellules souches sont des cellules humaines choisies dans le groupe constitué par les cellules souches embryonnaires à l'origine des cellules souches somatiques, et/ou les cellules souches/progéniteurs somatiques elles/eux mêmes à l'origine du sang et/ou de différents
10 tissus solides tels que la peau, le foie, le pancréas, le cœur, le rein, l'os, ou du tissu nerveux.

3. Utilisation d'un inhibiteur selon la revendication 1 ou la revendication 2, dans laquelle l'inhibiteur du développement cellulaire est choisi dans le groupe constitué par les produits de gènes contrôlant le développement cellulaire vis-à-vis de la différenciation cellulaire et/ou de la division cellulaire, les inhibiteurs des kinases
15 cyclines dépendantes, les facteurs contrôlant l'apoptose ou le vieillissement, et les cytokines (tels que les interférons, le TGF β).

4. Utilisation d'un inhibiteur selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, en association séquentielle avec un anti-inhibiteur de la prolifération cellulaire, pour déclencher un nombre de divisions cellulaires allant de 1 à environ 100, notamment de 1
20 à environ 10, et notamment pour déclencher une seule division cellulaire, tout en maintenant l'état indifférencié des cellules souches, notamment des cellules souches humaines.

5. Procédé de multiplication de cellules souches dans un milieu de culture, notamment de cellules souches humaines, caractérisé en ce qu'il comprend :

25 - une étape dans laquelle les cellules souches, notamment les cellules souches humaines, à l'état de repos sont sorties de leur état de repos par la neutralisation de l'effet d'un inhibiteur du développement cellulaire, et notamment d'un inhibiteur de la prolifération cellulaire produit par les cellules et/ou présent dans le milieu de culture, de telle sorte qu'il y ait déclenchement d'un nombre de divisions cellulaires allant de 1 à
30 environ 100, notamment de 1 à environ 10, et notamment d'une seule division cellulaire,

- et, une étape dans laquelle les cellules souches, notamment les cellules humaines, obtenues à l'étape précédente sont inhibées dans leur différenciation à l'aide d'un inhibiteur du développement cellulaire.

6. Procédé de multiplication selon la revendication 5, caractérisé en ce que à l'issue du procédé de multiplication, les cellules souches ainsi multipliées sont maintenues dans un état indifférencié.

7. Procédé de multiplication selon la revendication 5, caractérisé en ce que les cellules souches sont des cellules humaines choisies dans le groupe constitué par les cellules souches embryonnaires à l'origine des cellules souches somatiques, et les cellules somatiques elles mêmes à l'origine du sang et/ou des différents tissus solides tels que la peau, le foie, le pancréas, le cœur, le rein, l'os, ou du tissu nerveux.

8. Procédé de multiplication selon l'une des revendications 5 à 7, caractérisé en ce que les cellules souches, notamment les cellules humaines, sont présentes à une concentration cellulaire d'environ 1 à environ 10^{10} cellules par ml, et notamment à une concentration allant d'environ 10^3 à environ 10^{10} cellules par ml, et plus particulièrement d'environ 10^4 à environ 10^9 cellules par ml.

9. Procédé de multiplication selon l'une quelconque des revendications 5 à 8, caractérisé en ce que l'inhibiteur du développement cellulaire est synthétisé par les cellules souches, notamment les cellules souches humaines, et/ou est ajouté dans le milieu de culture contenant les cellules souches, notamment les cellules souches humaines.

10. Procédé de multiplication selon l'une quelconque des revendications 5 à 9, caractérisé en ce que l'inhibiteur du développement cellulaire est choisi dans le groupe constitué par les produits de gènes contrôlant le développement cellulaire vis-à-vis de la différenciation cellulaire et/ou de la division cellulaire, les inhibiteurs des kinases cyclines dépendantes, les facteurs contrôlant l'apoptose ou le vieillissement, et les cytokines (tels que les interférons, le TGF β)

11. Procédé de multiplication selon l'une quelconque des revendications 5 à 10, caractérisé en ce que l'inhibiteur du développement cellulaire est présent à une faible concentration dans le milieu de culture contenant les cellules souches, et notamment à une concentration allant d'environ 10^{-10} mg/ml à 1 mg/ml.

12. Procédé de multiplication selon l'une quelconque des revendications 5 à 11, caractérisé en ce que la neutralisation de l'effet de l'inhibiteur du développement cellulaire, et notamment de l'inhibiteur de la prolifération cellulaire, présent dans le milieu de culture, est effectuée par

- l'addition dans le milieu de culture, en quantité appropriée, d'un anti-inhibiteur de la prolifération cellulaire tel qu'un anti-TGF- β , et/ou

- le retrait du milieu de culture de l'inhibiteur du développement cellulaire, et notamment de l'inhibiteur de la prolifération cellulaire, appartenant notamment au groupe des cytokines.

13. Procédé de multiplication selon l'une quelconque des revendications 5 à 12, caractérisé en ce que l'anti-inhibiteur de la prolifération cellulaire est présent en une concentration allant d'environ 10^{-18} à environ 10^{-3} g/ml.

14. Procédé de multiplication selon l'une quelconque des revendications 5 à 13, dans lequel le milieu de culture contient des cellules souches hématopoïétiques et comprend une ou plusieurs cytokines (ajoutées dans le milieu de culture) choisies dans le groupe constitué par les interleukines et les CSF, lesdites cytokines étant présentes à une concentration allant d'environ 10^{-8} μ g/ml à environ 1 mg/ml, et notamment d'environ 10^{-5} μ g/ml à 0,1 μ g/ml.

15. Procédé de multiplication selon l'une quelconque des revendications 5 à 14, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) l'initiation d'un premier cycle de division de cellules souches embryonnaires ou somatiques non différenciées dans un milieu de culture, et notamment de cellules souches somatiques hématopoïétiques, par ensemencement de cellules souches embryonnaires ou somatiques non différenciées à l'état de repos, à une forte concentration cellulaire initiale, notamment à une concentration allant de 10^3 à 10^{10} cellules par ml, en présence d'une ou de plusieurs cytokines, et par la neutralisation de l'effet de l'inhibiteur du développement cellulaire, et notamment de l'inhibiteur de la prolifération cellulaire, présent dans le milieu de culture, de telle sorte que les susdites cellules sortent de leur état de repos par le déclenchement d'une première division cellulaire,

b) le retour au repos des cellules souches embryonnaires ou somatiques non différenciées obtenues à l'étape précédente, à l'aide d'un inhibiteur du développement cellulaire, ledit inhibiteur étant synthétisé par lesdites cellules souches, ou étant ajouté dans le milieu de culture,

c) le lavage éventuel des cellules souches embryonnaires ou somatiques non différenciées obtenues à l'étape précédente, afin d'éliminer les catabolites et l'inhibiteur

du développement cellulaire, et notamment l'inhibiteur de la prolifération cellulaire éventuellement présents dans le milieu de culture,

d) la dilution éventuelle des cellules souches embryonnaires ou somatiques non différenciées obtenues à l'étape précédente afin de maintenir une concentration cellulaire optimale allant d'environ 100 à 10^{10} cellules par ml,

e) la répétition successive des cycles de division et de repos décrits ci-dessus jusqu'à ce que le facteur d'amplification des cellules soit suffisant pour obtenir le nombre de cellules souches souhaitées, et notamment soit de 2 fois à environ 10^{12} fois le nombre de cellules souches embryonnaires ou somatiques non différenciées initiales, ce qui correspond à une durée totale du procédé de multiplication d'environ 1 jour à 3 ans, et notamment de 1 jour à 15 jours,

f) l'arrêt de la multiplication des cellules souches embryonnaires ou somatiques non différenciées pour les stocker, les utiliser ou les faire se différencier *in vitro*.

16. Procédé de multiplication selon l'une quelconque des revendications 5 à 15, caractérisé en ce que la durée d'un seul état de repos s'échelonne d'environ 1 heure à 3 ans, et est notamment d'environ 6 heures à 72 heures, et en ce que la durée d'un seul cycle de division s'échelonne d'environ 6 heures à 3 ans, et est notamment d'environ 6 heures à 24 heures.

17. Utilisation des cellules souches humaines non différenciées et amplifiées telles qu'obtenues selon le procédé de l'une quelconque des revendications 5 à 16, pour reconstituer du sang humain et/ou des tissus solides ou organes humains.